

ПАЙДЫГАНОВ АНДРЕЙ ПЕТРОВИЧ

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИОНОВ ВОДОРОДА
НА РАЗОБЩАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ
В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2004

Работа выполнена на кафедре биохимии и молекулярной биологии
Государственного образовательного учреждения высшего профессионального
образования «Марийский государственный университет» (г. Йошкар-Ола)

Научный руководитель: доктор биологических наук,
САМАРЦЕВ Виктор Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ГОРДОН Лев Хаймович
доктор медицинских наук, профессор
ЗУБАИРОВ Гилявер Мирзабулович

Ведущая организация:
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский
государственный университет.

Защита состоится «___» _____ 2004 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета № Д.212.081.08 при Государственном
образовательном учреждении высшего профессионального образования
«Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина» по
адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного
образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина».

Автореферат разослан «___» _____ 2004 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук,

Аскарова А.Н.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Чезганова С.А. Разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях печени жирными кислотами, лаурилсульфатом и ДНФ при различных значениях pH среды инкубации / С.А. Чезганова, А.П. Пайдыганов, В.Н. Самарцев // Четвертые Вавиловские чтения. - Йошкар-Ола, 2000. С. 117–119.
- 2.. Самарцев В.Н. Термодинамическая характеристика путей свободного окисления в митохондриях печени / В.Н. Самарцев, Л.С. Полищук, А.П. Пайдыганов // Биофизика. - 2003. - Т. 48, вып. 1. - С. 49-53.
3. Самарцев В.Н. Температурная зависимость дыхания митохондрий печени крыс при разобщении окислительного фосфорилирования жирными кислотами. Влияние неорганического фосфата / В.Н. Самарцев, С.А. Чезганова, Л.С. Полищук, А.П. Пайдыганов, О.В. Видякина, И.П. Зелди // Биохимия. - 2003. - Т. 68, вып. 6. - С. 1137-1143.
- 4.. Пайдыганов А.П. Участие переносчика фосфата в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени / А.П. Пайдыганов, В.Н. Самарцев // Биология наука XXI века. 7-ая Пушкинская школа-конференция молодых ученых 14-18 апреля 2003 г. – Пушкино, 2003. - С. 360.
- 5.. Видякина О.В. Разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях при действии токсических веществ / О.В. Видякина, А.П. Пайдыганов, В.Н. Самарцев // Химическое загрязнение среды обитания и проблемы экологической реабилитации нарушенных экосистем. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции. – Пенза, 2003. - С. 28-30.
6. Пайдыганов А.П. Сравнительное исследование протонофорного и ионофорного разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при различных pH среды инкубации / А.П. Пайдыганов, Л.С. Полищук, В.Н. Самарцев // Седьмые Вавиловские чтения. Глобализация и проблемы национальной безопасности России в XXI веке. Материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции. - Йошкар-Ола, 2003. - С. 160-166.
- 7.. Самарцев В.Н. Изучение разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при различных pH среды инкубации / В.Н. Самарцев, А.П. Пайдыганов, Л.С. Полищук, И.П. Зелди // Биологические мембраны. - 2004. - Т. 21, № 1. - С. 39-45.
- 8.. Полищук Л.С. Онкотическое давление как фактор регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени / Л.С. Полищук, А.П. Пайдыганов, В.Н. Самарцев // Биологические мембраны. - 2004. - Т. 21, № 3. - С. 210-213.
- 9.. Самарцев В.Н. Особенности разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени млекопитающих с различной массой тела / В.Н. Самарцев, Л.С. Полищук, А.П. Пайдыганов, И.П. Зелди // Биохимия. - 2004. - Т. 69, вып.6. - С. 832 – 842.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В клетках печени около 30% потребления кислорода митохондриями не связано с синтезом АТФ и обусловлено пассивной утечкой протонов через внутреннюю мембрану органелл (Rolfe and Brand, 1997). Предполагается, что основными физиологическими функциями этого дыхания, которое В.П. Скулачевым названо свободным окислением является возрастание теплопродукции при охлаждении и участие в защите от повреждающего действия активных форм кислорода, образующегося в митохондриях (Rolfe and Brand, 1997; Скулачев, 1989).

В митохондриях печени свободное окисление практически полностью обусловлено функционированием так называемого протонного футильного цикла, когда энергия, запасенная в форме $\Delta\mu_{\text{H}^+}^+$, рассеивается в виде тепла благодаря пассивной утечке протонов через внутреннюю мембрану (Самарцев и Полищук, 2002). Можно выделить два основных пути пассивной утечки протонов в митохондриях. Один из этих путей обусловлен протонофорным действием свободных жирных кислот. Другой путь, без жирных кислот, по-видимому, происходит за счет пассивной диффузии протонов или при участии специальных разобщающих белков - аналогов разобщающего белка митохондрий бурого жира термогенина (Stuart at al., 2001), или непосредственно через фосфолипидный бислой (Gutknecht, 1987a). Можно ожидать, что эти пути пассивной утечки протонов будут иметь различные термодинамические характеристики, в частности, различные величины энергии активации. Низкая величина энергии активации характерна для каналов, а высокая - для переносчиков (Шольц, 1994). Определив энергию активации, можно выяснить, какие мембранные структуры формируют пути пассивной утечки протонов при свободном окислении.

Протонофорное разобщающее действие жирных кислот в печени обусловлено, главным образом, участием белков-переносчиков, расположенных во внутренней мембране митохондрий: ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров. Суммарная доля участия этих белков в разобщении достигает 80% (Samartsev at al., 1997). Ежек и Крамер исследовали еще один из белков внутренней мембраны митохондрий – переносчик фосфата. В опытах на реконструированной системе со встроенным в липосомы переносчиком фосфата из митохондрий дрожжей они показали способность этого белка ускорять трансмембранный циклический транспорт протонов жирными кислотами (Zackova at al., 2000). Вполне возможно, что переносчик фосфата также принимает участие в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени. В этом случае можно ожидать, что субстрат этого переносчика - фосфат и его ингибитор мерсалил будут обладать респираторным действием так же, как субстраты и ингибиторы других переносчиков анионов, участвующих в разобщении.

В опытах на энергизованных митохондриях показано, что жирные кислоты индуцируют захват различных моновалентных катионов, и этот процесс

сопровождается набуханием митохондрий и подавляется ионами магния (Schönfeld et al., 2001). Ионофорное действие жирных кислот существенно усиливается при повышении pH. Предполагается, что в ионофорном действии участвуют только анионы жирных кислот. Анализ литературных данных о разобщающем действии жирных кислот свидетельствует о том, что в отсутствии ионов кальция ионофорное разобщающее действие жирных кислот может протекать одновременно с протонофорным.

Возможны различные пути регуляции разобщающего действия жирных кислот. Один из них - изменение количества молекул жирных кислот, взаимодействующих с ADP/ATP- антипортером и аспартат/глутаматным антипортером, при различных воздействиях на митохондрии. Ранее Самарцевым В.Н. было установлено, что участие этих переносчиков в разобщении разнонаправлено, но в равной степени изменяется при изменении pH среды инкубации: при повышении pH от 7,0 до 7,8 степень участия в разобщении ADP/ATP- антипортера увеличивается, а аспартат/глутаматного антипортера в такой же степени уменьшается (Самарцев и др., 1999). Однако необходимы дальнейшие исследования для обоснования этого механизма регуляции.

Цель работы. Целью настоящей работы является получение новых данных о механизмах и путях регуляции свободного окисления в митохондриях печени. Для достижения этой цели нами были поставлены следующие задачи:

1. Дать оценку температурной зависимости дыхания митохондрий в присутствии и отсутствии жирных кислот.

2. Исследовать влияние неорганического фосфата и ингибитора переносчика фосфата мерсалила на разобщающее действие жирных кислот.

3. Изучить зависимость разобщающей активности пальмитата при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров от доли анионной и протонированной форм жирных кислот.

4. Оценить влияние трис(оксиметил)аминометана на разобщающую активность жирных кислот.

Научная новизна и научно-практическая ценность работы. Впервые исследована температурная зависимость протонофорного разобщающего действия жирных кислот. Установлено, что в координатах Аррениуса температурная зависимость имеет перегиб при 22° С, что отражает фазовый переход фосфолипидного бислоя мембраны митохондрий. В отличие от этого температурная зависимость дыхания митохондрий в отсутствии жирных кислот (в состоянии 4) в координатах Аррениуса линейна. Эти результаты рассматриваются как свидетельство о том, что в отсутствии жирных кислот дыхание митохондрий обусловлено возвращением протонов в матрикс через какие-либо каналы, и этот путь не зависит от текучести мембраны. Вторым путем свободного окисления обусловлен разобщающим действием жирных кислот при участии переносчиков субстратов, и этот процесс зависит от текучести мембраны митохондрий.

ВЫВОДЫ

1. Характер изменения дыхания митохондрий при повышении температуры свидетельствует о том, что разобщающее действие жирных кислот зависит от текучести мембраны, в то время как в отсутствии жирных кислот свободное окисление обусловлено возвращением протонов в матрикс через каналы или путем свободной диффузии и этот процесс не зависит от текучести мембраны.
2. Неорганический фосфат и мерсалил подавляют разобщающее действие пальмитата. Эти результаты рассматриваются как свидетельство о том, что в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени принимает участие переносчик фосфата.
3. При повышении доли анионной формы пальмитата вклад ADP/ATP антипортера в разобщающем действии пропорционально увеличивается, а вклад аспартат/глутаматного антипортера в той же степени пропорционально уменьшается.
4. Разобщающее действие пальмитата в отсутствии ионов магния усиливается трис(оксиметил)аминометаном. Усиление разобщения обусловлено транспортом этого катиона в комплексе с анионом пальмитата в матрикс митохондрий.

свидетельствуют о том, что пальмитат содействует транспорту катионов TRIS в матрикс митохондрий, т.е. обладает ионофорной активностью. Этот транспорт, как и транспорт других моновалентных катионов, подавляется ионами магния.

Разобщающее действие пальмитата в TRIS-сахарозной среде в присутствии ионов магния не зависит, а в отсутствии - зависит от pH среды инкубации. Проведенные нами расчеты показали, что при величине наблюдаемой pK_a для карбоксильной группы 7.365, в условиях образования соли $RCOO^- \cdot NR_3H^+$, разобщающая активность пальмитата повышается пропорционально увеличению доли анионов и достигает предела, когда все молекулы депротонированы, вместе с тем, когда все анионы протонированы, пальмитат не обладает ионофорной активностью (рис. 6).

Карбоксиатрактилат эффективно подавляет разобщающее действие пальмитата в TRIS-сахарозной среде в отсутствии и присутствии ионов магния. В первом случае на $53 \pm 6\%$, во втором - на $57 \pm 9\%$. Следовательно, карбоксиатрактилат в равной степени подавляет как протонофорную активность пальмитата, так и его активность связанную с образованием соли $RCOO^- \cdot NR_3H^+$. Это свидетельствует об участии ADP/ATP-антипортера в разобщающем действии пальмитата, сопряженном с транспортом катионов TRIS в матрикс митохондрий.

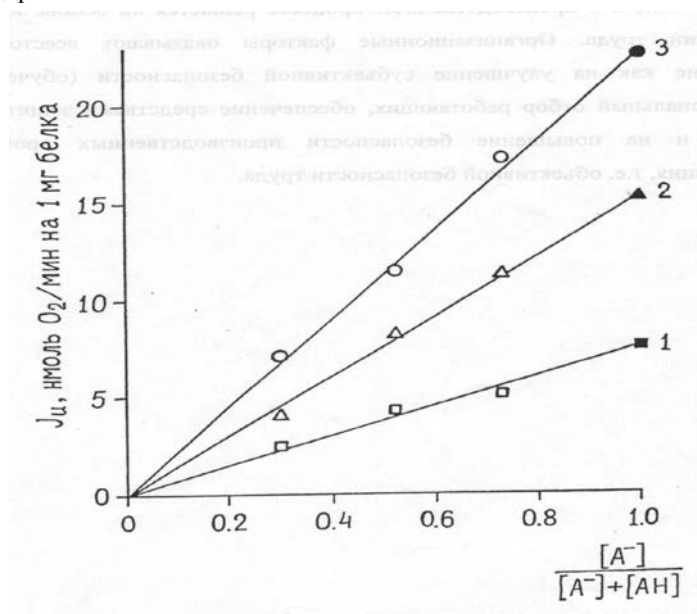


Рисунок 6. Зависимость сопряженной с транспортом катионов TRIS разобщающей активности 10 (1), 20 (2) и 30 (3) мкМ пальмитата от относительного количества его анионов. Заштрихованные символы - рассчитанные предельные величины ионофорной активности пальмитата.

Впервые установлено, что в протонофорном разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени принимает участие переносчик фосфата. Этот вывод в существенной степени основан на обнаруженной способности субстрата этого переносчика неорганического фосфата, а также его ингибитора мерсалила частично подавлять разобщающее действие пальмитата. Ресопрягающие эффекты неорганического фосфата и мерсалила с одной стороны и карбоксиатрактилата и аспартата - с другой неаддитивны. Эти (и другие) данные позволяют говорить о том, что переносчик фосфата участвует в разобщении только в комплексе с ADP/ATP- и аспартат/глутаматным антипортерами.

Впервые, основываясь на уравнении Гендерсона-Гассельбаха, рассчитана доля участвующих в разобщении анионных и нейтральных форм пальмитата на внутренней мембране митохондрий. Проведенные расчеты показали, что при повышении доли анионной формы пальмитата вклад ADP/ATP антипортера в разобщение пропорционально увеличивается, а вклад аспартат/глутаматного антипортера в той же степени пропорционально уменьшается.

Впервые установлено, что разобщающее действие пальмитата усиливается TRIS (трис(оксиметил)аминометан) Этот эффект TRIS устраняется ионами магния и обусловлен транспортом катиона TRIS вместе с анионами пальмитата в матрикс. Полученные результаты рассматриваются как свидетельство о том, что эффект TRIS обусловлен переносом его катионов вместе с анионами пальмитата в матрикс с последующим депротонированием катионов и транспорта нейтральных молекул TRIS и анионов пальмитата в противоположном направлении.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на Всероссийской междисциплинарной научной конференции (Вавиловские чтения, Йошкар-Ола, 2000); Всероссийской научно-практической конференции «Химическое загрязнение среды обитания и проблемы экологической реабилитации нарушенных экосистем» (Пенза, 2003); 7-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых 14-18 апреля 2003г «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2003); Всероссийской междисциплинарной научной конференции (Вавиловские чтения, Йошкар-Ола, 2003); научных конференциях преподавателей и сотрудников Марийского государственного университета (1999-2004); на совместном заседании кафедр биологии человека, биологии растений, экологии, биохимии и молекулярной биологии 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста, иллюстрирована 10 таблицами и 14 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных в работе материалов и методов исследований, полученных экспериментальных данных, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 190 библиографических названий, в том числе 158 зарубежных.

Материал и методы исследований

Выделение митохондрий из печени крыс.

Митохондрии выделяли из печени белых крыс массой 180 - 220 г методом дифференциального центрифугирования. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 2 мМ ЭГТА (этиленгликоль-бис-(2-амино-этиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота) и 5 мМ MOPS-KOH (pH 7,4). Охлажденную в снегообразной среде выделения печень отмывали от крови, продавливали через пресс из нержавеющей стали с диаметром отверстий около 1 мм, а затем вручную гомогенизировали тefлоновым пестиком в гомогенизаторе из пирекса (отношение массы ткани и среды 1: 10). Гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и центрифугировали 10 минут при 700 g. Для удаления эндогенных жирных кислот митохондрии преинкубировали с очищенным от жирных кислот БСА (бычий сывороточный альбумин). Митохондрии осаждали 10 минут при 10000 g и суспендировали в 1 мл среды выделения, дополнительно содержащей БСА (3 мг/мл), затем добавляли 15 мл среды выделения без БСА и вновь центрифугировали 10 мин при 10000 g. Суспензию митохондрий (60-70 мг митохондриального белка в 1 мл среды выделения) хранили на льду. Белок определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

Регистрация дыхания суспензии митохондрий.

Дыхание митохондрий регистрировали с помощью кислородного электрода типа Кларка или открытого платинового электрода в термостатируемой ячейке и полярографа LP-9. Объем ячейки - 1 мл. Концентрация в ячейке белка митохондрий печени - 1 мг/мл.

Регистрация светорассеяния суспензий изолированных митохондрий.

При изучении набухания митохондрий оптическим методом регистрировали динамику изменения интенсивности света (изменение оптической плотности) при длине волны 630 нМ, прошедшего через суспензию митохондрий, с помощью спектрофотометра СФ-46. Концентрация белка митохондрий в кювете - 0,5 мг/мл.

Основная часть экспериментов проведена в присутствии в средах инкубации митохондрий ЭГТА, чтобы исключить индукцию жирными кислотами Ca^{2+} -зависимой пермеабилзации митохондрий. Олигомицин (2 мкг/мл) и 2 мкМ ротенон добавляли в кислородную ячейку или в кювету спектрофотометра сразу после митохондрий.

Среда инкубации содержала 250 мМ сахарозу, 5 мМ сукцинат калия, 10 мМ KCl, 0,5 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl_2 , 5 мМ MOPS-TRIS (pH 7,4). В опытах по исследованию действия фосфата в среду инкубации дополнительно добавляли 5 мМ KH_2PO_4 (pH 7,4). В опытах использовались только препараты митохондрий, имеющие коэффициент дыхательного контроля, измеренный как степень стимуляции дыхания 50 мкМ ДНФ (динитрофенол) при 25°C, не менее 7.

Разобщающее действие жирных кислот оценивали по величине стимуляции дыхания митохондрий ($J_u - J_o$), или по степени стимуляции дыхания

наблюдаемой рКа карбоксильной группы пальмитата, определенная по ур.2, составляет 7.365, что соответствует, согласно литературным данным, величине рКа карбоксильных групп жирных кислот на поверхности фосфолипидных мембран. Зная величину рКа, можно, исходя из уравнения Гендерсона-Гассельбаха, легко вычислить доли анионной или нейтральной форм пальмитата при различных значениях pH. При повышении доли анионной формы пальмитата величина J_{u1} пропорционально увеличивается, а величина J_{u2} - в той же степени пропорционально уменьшается. В пределе, когда все анионы пальмитата протонированы, в разобщении принимает участие только аспартат/глутаматный антипортер, в другом пределе, когда присутствуют только анионы пальмитата, в разобщении принимает участие только ADP/ATP-антипортер.

4. Ионофорное разобщающее действие жирных кислот в митохондриях печени

Результаты экспериментов на модельных мембранных системах свидетельствуют о том, что жирные кислоты способны переносить через гидрофобный барьер как протоны, так и другие, главным образом моновалентные, катионы. В опытах на энергизованных митохондриях показано, что жирные кислоты индуцируют захват различных моновалентных катионов, и этот процесс сопровождается набуханием митохондрий и подавляется ионами магния (Schönfeld at al., 2001). Это набухание не связано с индукцией кальций-зависимой неспецифической проницаемости митохондрий, так как не подавляется ЭГТА и циклоспорином А. Проникающие ионы и ионофоры относят к разобщителям окислительного фосфорилирования, однако они вызывают лишь кратковременное разобщение, поскольку вызывают быстрое защелачивание матрикса митохондрий (Rottenberg at al., 1990). Это в полной мере относится и к жирным кислотам. Очевидно, что для пролонгирования ионофорного разобщения необходимо чтобы одновременно с катионом в матрикс переносился и протон. Наше внимание привлек TRIS, как один из потенциальных проникающих катионов, способный депротонироваться в матриксе. Ионофорное действие жирных кислот существенно усиливается при повышении pH. Можно полагать, что в ионофорном действии участвуют только анионы жирных кислот.

Катионы TRIS в концентрации 70 мМ увеличивают скорость дыхания в отсутствие ионов магния и не оказывают влияния на скорость дыхания в присутствии 3 мМ MgCl_2 . Эти данные свидетельствуют о том, что катионы TRIS образуют соли с анионами жирной кислоты ($\text{RCOO}^- \cdot \text{NR}_3\text{H}^+$), а ионы магния препятствуют образованию этой соли. В TRIS-сахарозной среде инкубации оптическая плотность суспензии митохондрий быстро уменьшается в присутствии пальмитата, что свидетельствует об интенсивном набухании органелл, и этот процесс подавляется ионами магния. Полученные результаты

увеличивается, а составляющая разобщающей активности J_{u2} , наоборот, значительно уменьшается. В свою очередь сумма этих величин ($J_{u1} + J_{u2}$) также не зависит от pH среды инкубации.

Недавно Самарцевым В.Н. с соавторами было предположено, что жирные кислоты в нейтральной форме лучше доступны для аспартат/глутаматного антипортера, а в анионной - для ADP/ATP-антипортера. Можно допустить, что величина, характеризующая участие в разобщении ADP/ATP-антипортера, пропорциональна количеству анионов ($J_{u1} = k_1 [A^-]$), а величина, характеризующая участие в разобщении аспартат/глутаматного антипортера, пропорциональна количеству нейтральных молекул жирных кислот ($J_{u2} = k_2 [AH]$). Как следует из таблицы 2, при любом сдвиге pH абсолютные значения изменений величин J_{u1} и J_{u2} равны между собой и в сумме эти величины не зависят от pH, а это возможно только при условии, что $k_1 = k_2$. Отсюда:

$$\frac{J_{u1}}{J_{u2}} = \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (1)$$

Относительное содержание анионных и нейтральных форм карбоксильных групп жирных кислот на поверхности фосфолипидных мембран при различных значениях pH среды инкубации может быть определено по уравнению Гендерсона - Гассельбаха. Основываясь на этом, ур. 1 можно преобразовать как:

$$\lg \frac{J_{u1}}{J_{u2}} = \text{pH} - \text{pK}_a \quad (2)$$

Как показано на рис. 5, существует линейная зависимость между логарифмом отношения величин J_{u1} и J_{u2} и pH среды инкубации с тангенсом угла наклона прямой 1, это подтверждает справедливость ур. 2. Величина

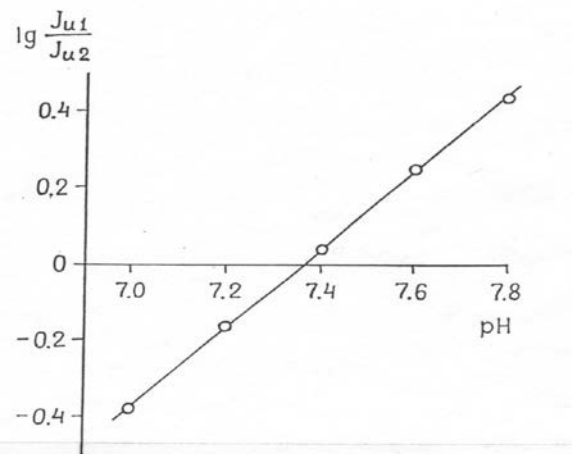


Рисунок 5. Зависимость логарифма отношения составляющих разобщающей активности пальмитата J_{u1} и J_{u2} от pH среды инкубации.

(по формуле $(J_u - J_o)/J_o$), где J_o и J_u скорости дыхания митохондрий, соответственно, до и после добавления жирной кислоты.

Ресопрягающий эффект фосфата рассчитывали по формуле $(J_u - J_{up})/(J_u - J_o)$, где J_{up} - скорость дыхания в присутствии фосфата и жирной кислоты.

Величину энергии активации (E_a) определяли графически, исходя из интегральной формы уравнения Аррениуса (Келети, 1990). Коэффициент управления дыханием для пассивной утечки протонов определяли графическим методом (Самарцев и Полищук, 2002).

В работе использовали MOPS, TRIS, ADP, пальмитиновую и лауриновую кислоты, олигомицин, мерсалил, сукцинат калия, глутамат калия, карбоксиатрилат, очищенный от жирных кислот БСА ("Sigma", США), ротенон, ЭГТА ("Serva", Германия), KCl, KH_2PO_4 , MgCl_2 ("Merck", Германия).

Сахарозу перекристаллизовывали, осаждая ее этанолом из водного раствора. Использовали растворы пальмитиновой и лауриновой кислот (10 mM и 20 mM) в этаноле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Температурная зависимость дыхания митохондрий печени крыс при разобщении окислительного фосфорилирования жирными кислотами.

Согласно гипотезе В.П. Скулачева, которая легла в основу современных представлений о механизме разобщающего действия жирных кислот, функций UCP-1 (разобщающий белок бурой жировой ткани) и ADP/ATP-антипортера является перенос аниона жирной кислоты с внутреннего монослоя мембраны на наружный, а последующий перенос недиссоциированной формы кислоты через бислой осуществляется без участия белков по механизму флип-флоп. Эта гипотеза получила свое дальнейшее развитие и экспериментальное подтверждение в работах на реконструированной системе со встроенным в липосомы UCP-1. Различные варианты этой гипотезы применяются для объяснения разобщающего действия жирных кислот при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного. Анионы жирных кислот с очень низкой скоростью переходят из внутреннего монослоя мембраны на наружный из-за существования высокого энергетического барьера (Schönfeld, 1992). Преодолению этого барьера могут способствовать положительно заряженные группы мембранных белков или липофильные анионы. Энергию активации транспорта аниона жирной кислоты можно определить из температурной зависимости разобщающего действия жирных кислот, так как именно транспорт аниона жирной кислоты лимитирует этот процесс.

При исследовании температурной зависимости дыхания митохондрий все эксперименты были проведены в присутствии в среде инкубации ЭГТА, ионов магния и олигомицина. ЭГТА, связывая ионы кальция, препятствует индукции жирными кислотами Ca^{2+} -зависимой неспецифической проницаемости митохондрий, а ионы магния подавляют ионофорное действие жирных кислот.

Наличие олигомицина необходимо для подавления циклов гидролиза-ресинтеза АТФ, один из них, как известно, может индуцироваться жирными кислотами. В присутствии ЭГТА, ионов магния и олигомицина стимуляция дыхания митохондрий жирными кислотами обусловлена только их протонофорным действием, главным образом, при участии ADP/АТФ-антипортера и аспартат/глутаматного антипортера.

В таблице 1 приведены результаты исследования влияния повышения температуры на дыхание митохондрий в присутствии и отсутствии пальмитата от 13 до 37°C. Как видно из таблицы, при повышении температуры увеличивается как скорость дыхания в состоянии 4, так и скорость дыхания в присутствии пальмитата. Однако если при повышении температуры с 13 до 37°C скорость дыхания в состоянии 4 увеличивается только в 1,7 раза, то в присутствии 40 мкМ пальмитата скорость дыхания увеличивается в 6,6 раза. При всех температурах последующее добавление ДНФ приводит к дополнительной стимуляции дыхания в 2 - 3 раза (таблица 1). Следовательно, даже при концентрации 40 мкМ пальмитат вызывает лишь частичное разобщающее действие на митохондрии, т.е. транспорт одной из форм пальмитата лимитирует процесс.

Таблица 1. Изменение скорости дыхания митохондрий печени (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка) в отсутствии и присутствии пальмитата и ДНФ при повышении температуры с 13 до 37°C

$t^{\circ}C$	Пальмитат, мкМ					
	0	10	20	30	40	+ 50 ДНФ
13	8,1±0,4	9,4±0,4	10,2±0,5	11,1±0,4	11,9±0,6	24,5±1,1
17	8,7±0,4	11,0±0,3	13,1±0,5	15,0±0,5	16,7±0,6	36,7±1,7
21	9,9±0,5	14,5±0,5	18,6±0,6	22,0±0,5	26,7±0,7	58,9±1,8
25	10,9±0,3	17,7±0,4	24,9±0,4	30,8±0,6	35,8±0,5	76,6±3,9
31	12,1±0,7	22,0±0,6	31,1±0,7	41,9±0,9	50,5±1,0	98,1±4,1
37	14,3±0,6	29,8±0,8	44,9±1,1	63,1±0,9	78,0±1,3	131,3±6,6

Обращает на себя внимание то, что при всех температурах зависимость скорости дыхания от концентрации пальмитата близка к линейной. Как известно, близкая к линейной зависимость скорости дыхания митохондрий от концентрации протонофора свидетельствует о том, что наибольший вклад в управление дыханием вносит стадия возвращения протонов в матрикс (Groen et al., 1982).

Таким образом, полученные данные можно рассматривать как свидетельство в пользу того, что в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени принимает участие переносчик фосфата.

3. Влияние pH среды инкубации на протонофорное разобщающее действие жирных кислот

Как известно, в присутствии ионов магния в среде инкубации стимуляция дыхания митохондрий жирными кислотами обусловлена только их протонофорным действием (Самарцев и др., 1999). Протонофорную разобщающую активность жирных кислот можно определить как разницу между скоростью дыхания митохондрий после и до добавления жирной кислоты ($J_u = J_{u0} - J_0$). Эту активность можно разделить на три составляющие -чувствительную к карбоксиатрактилату (J_{u1}), чувствительную к глутамату (J_{u2}) и нечувствительную к карбоксиатрактилату и глутамату (J_{u3}). Первые две составляющие, можно определить как величины снижения разобщающей активности под влиянием, соответственно, карбоксиатрактилата и глутамата, они характеризуют участие в разобщении, соответственно, ADP/АТФ-антипортера и аспартат/глутаматного антипортера. Третью составляющую можно определить как остаток разобщающей активности после добавления карбоксиатрактилата и глутамата, которая обусловлена не идентифицированными факторами (структурами), участвующими в разобщении. При условии, что ADP/АТФ-антипортер, аспартат/глутаматный антипортер и другие структуры содействуют образованию параллельных путей возвращения протонов в матрикс, разобщающая активность жирных кислот равна сумме составляющих частей ($J_u = J_{u1} + J_{u2} + J_{u3}$).

Таблица 2. Суммарная разобщающая активность пальмитата (J_u) и составляющие части разобщающей активности: чувствительная к карбоксиатрактилату (J_{u1}), чувствительная к глутамату (J_{u2}) и нечувствительная к карбоксиатрактилату и глутамату (J_{u3}).

Символы	pH 7,0	pH 7,2	pH 7,4	pH 7,6	pH 7,8
J_u	15,7 ± 0,4	15,6 ± 0,3	15,4 ± 0,9	15,7 ± 0,8	15,6 ± 0,8
J_{1Kamp}	3,5 ± 0,4	5,0 ± 0,2	6,2 ± 0,6	7,7 ± 0,3	8,9 ± 0,5
$J_{2Глу}$	8,7 ± 0,5	7,3 ± 0,7	5,8 ± 0,5	4,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3
J_3	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,7	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,1
$J_{1Kamp} + J_{2Глу}$	12,2 ± 0,3	12,3 ± 0,7	12,1 ± 0,8	12,1 ± 0,3	12,3 ± 0,3

Как следует из данных таблицы 2, суммарная разобщающая активность пальмитата не изменяется при повышении pH среды инкубации с 7.0 до 7.8 и также не зависит от pH составляющая разобщающей активности J_{u3} . Однако при тех же условиях составляющая разобщающей активности J_{u1} существенно

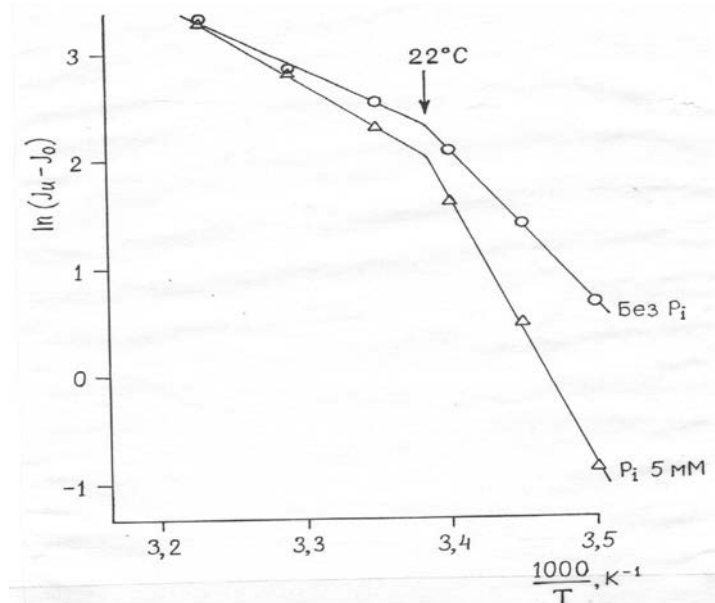


Рисунок 4. Температурные зависимости разобщающего действия пальмитата в концентрации 20 мкМ в присутствии и в отсутствие фосфата (P_i). График Аррениуса.

37°C - с 56 кДж/моль до 67 кДж/моль. Эти данные свидетельствуют о значительном увеличении фосфатом температурной зависимости разобщающего действия пальмитата.

Если при 19°C в отсутствие карбоксиатрактилата и глутамата фосфат подавляет разобщающее действие пальмитата на 36%, то при одновременном присутствии этих респондирующих агентов он не оказывает влияния. В свою очередь, в присутствии фосфата карбоксиатрактилат и глутамат подавляют разобщающее действие пальмитата на меньшую величину.

Ингибитор переносчика фосфата мерсалил и сам фосфат в равной степени подавляют стимуляцию дыхания митохондрий лауратом, однако их эффекты не являются аддитивными. Ранее было установлено, что наибольший вклад в разобщающее действие лаурата в отличие от пальмитата вносит аспартат/глутаматный антипортер. Один из субстратов этого переносчика аспартат способен эффективно подавлять разобщающее действие жирных кислот (Samartsev et al., 1997). Респондирующее действие аспартата под влиянием фосфата или мерсалила заметно снижается: если в отсутствие фосфата и мерсалила аспартат подавляет стимуляцию дыхания лауратом на 47%, то в присутствии мерсалила - на 28%, а в присутствии фосфата - на 31%. В свою очередь и фосфат и мерсалил значительно слабее подавляют разобщающее действие лаурата в присутствии аспартата.

На рис. 1 (график Аррениуса) представлены температурные зависимости скорости дыхания митохондрий в состоянии 4 (прямая 1) и в присутствии пальмитата в концентрациях 10 мкМ (прямая 2) и 30 мкМ (кривая 3 без выраженного перегиба). Как следует из рис. 4, дыхание митохондрий в состоянии 4 характеризуется значением энергии активации (E_a), равным 17 кДж/моль, а в присутствии пальмитата - более высокой величиной E_a .

На графике Аррениуса температурная зависимость стимуляции дыхания митохондрий пальмитатом при концентрациях от 10 до 40 мкМ представляет собой два линейных участка с перегибом при 22°C (рис. 2).

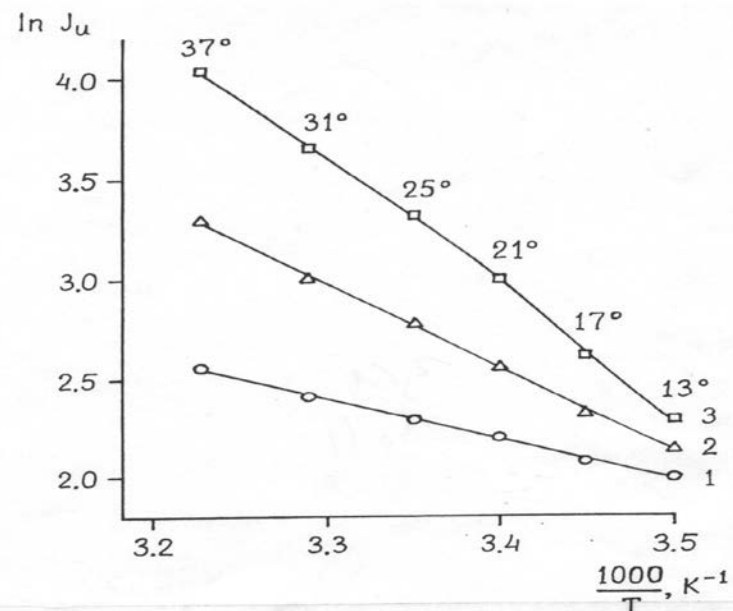


Рисунок 1. Температурные зависимости скоростей дыхания митохондрий в отсутствии (1) и в присутствии 10 (2) и 30 (3) мкМ пальмитата. График Аррениуса

В связи с тем, что в разобщающем действии жирных кислот принимают участие переносчики анионов внутренней мембраны митохондрий, можно было бы ожидать, что температурная зависимость разобщающего действия жирных кислот будет иметь сходство с температурной зависимостью активности переносчиков. Действительно, сходство заключается в том, что при температуре выше 22°C величины E_a переносчиков очень близки величине наблюдаемой E_a разобщающего действия пальмитата. Однако в отличие от полученных нами данных, на графике Аррениуса температурная зависимость активности ADP/ATP-антипортера митохондрий печени имеет перегиб при 13,5°C, а температурная зависимость

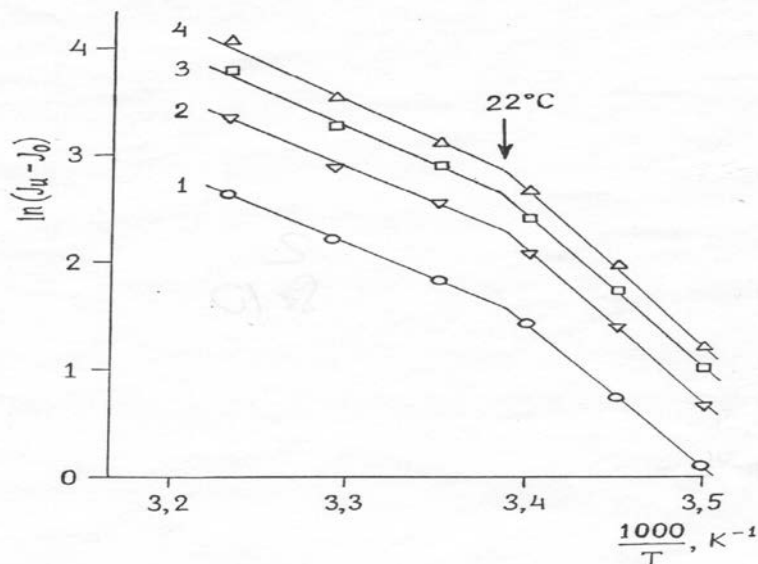


Рисунок 2. Температурная зависимость стимуляции дыхания митохондрий (в нмолях O_2 /мин на 1 мг белка) пальмитатом в концентрации 10 (1), 20 (2), 30 (3), 40 мкМ (4). График Аррениуса.

активности аспартат/глутаматного антипортера митохондрий печени не имеет перегиба в интервале от 1 до 35°C. Наличие перегиба на графике Аррениуса около 20 - 22°C характерно для температурной зависимости подвижности включенных в фосфолипиды митохондрий гидрофобных молекул - спин-меченых и флюоресцентных зондов и, следовательно, для температурной зависимости текучести фосфолипидного бислоя митохондрий, а также для температурной зависимости активности цитохром с-редуктазы митохондрий. Предполагается, что точка перегиба температурной кривой отражает скачкообразное изменение текучести мембраны митохондрий, что может быть обусловлено фазовым переходом липидов (Auger et al., 1984).

2. Влияние фосфата неорганического и мерсалила на разобщающее действие жирных кислот

Недавно в опытах на реконструированной системе со встроенным в липосомы переносчиком фосфата из митохондрий дрожжей была показана способность этого белка ускорять трансмембранный циклический транспорт протонов жирными кислотами так же, как и в аналогичной системе с разобщающим белком митохондрий бурой жировой ткани UCP-1 (Zackova et al., 2000). Было также установлено, что электронейтральный захват фосфата митохондриями печени и сердца ингибируется жирными кислотами. Вполне

возможно, что переносчик фосфата также принимает участие в разобщающем действии жирных кислот в митохондриях печени. В этом случае можно ожидать, что субстрат этого переносчика - фосфат - будет обладать ресопрягающим действием так же, как субстраты других переносчиков анионов, участвующих в разобщении.

Фосфат при 25°C в малой степени подавляет разобщающее действие пальмитата (рис.3, а), но его действие значительно усиливается при снижении температуры до 13°C (рис. 3, б). При любой температуре повышение концентрации пальмитата приводит к снижению ресопрягающего эффекта фосфата. На графике Аррениуса температурная зависимость стимуляции дыхания пальмитатом в присутствии 5 мМ фосфата так же, как и в отсутствие его, представляет собой два линейных участка с перегибом при 22°C (рис. 4). Однако эта зависимость в присутствии фосфата имеет значительно больший наклон, чем в отсутствие его (рис. 4). В пределах от 13 до 22°C E_a под влиянием фосфата возрастает с 128 кДж/моль до 208 кДж/моль, а в пределах от 22°C до

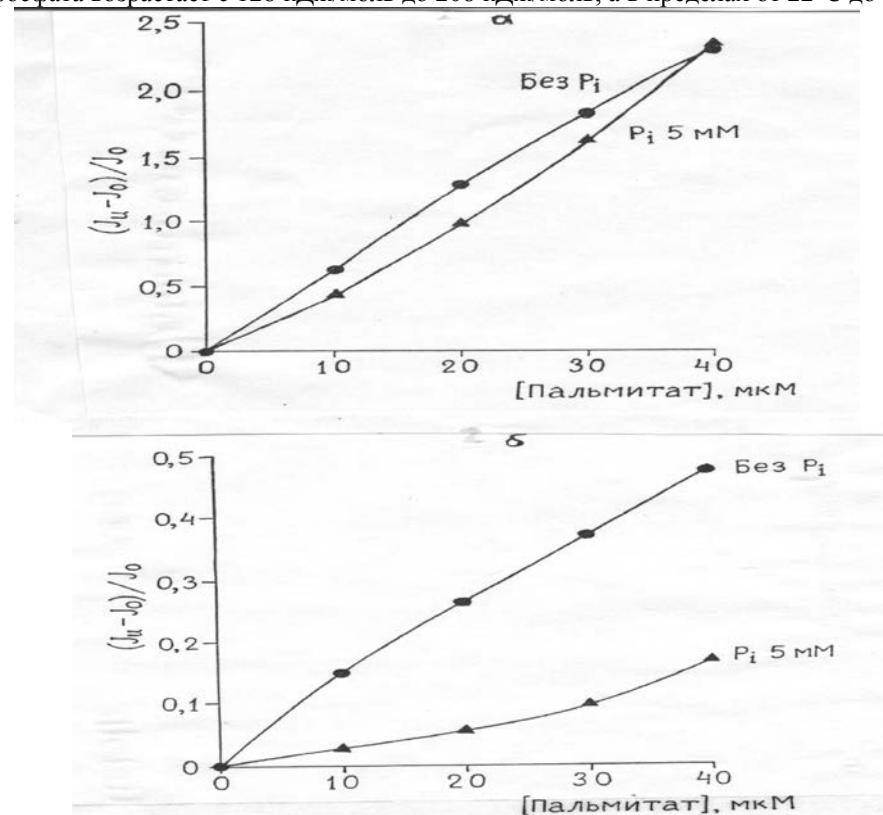


Рисунок 3. Влияние фосфата (P_i) на разобщающее действие пальмитата при 25°C (а) и 13°C (б).